

應用複合聚合酶連鎖反應檢測沙門氏桿菌

張惟茗^{*1}、廖明輝²、林敬覆¹、黃春申¹、郭靜蕙¹、蕭終融¹

¹行政院農業委員會家畜衛生試驗所

²國立屏東科技大學獸醫學系

摘要

在獸醫、醫學或公共衛生環境保護等領域，沙門氏桿菌的檢測是一項重要但卻繁複的工作。傳統方法從檢體處理、培養至鑑定常需耗時 3 至 7 天才能完成，且相當耗費人力及材料。有鑑於此，本報告利用複合聚合酶連鎖反應(multiplex polymerase chain reaction, MPCR)快速及操作簡便的特點，進行 invA 及 IS200 基因檢測以輔助沙門氏桿菌之鑑定。本實驗共使用共 263 株分屬 23 種以上不同血清型之沙門氏桿菌，其中 O 抗原有 A、B、C1、C2、D1、D2、E1 及 E2 群等，包括 12 株標準株及 251 株分離株進行測試。以 MPCR 檢測結果為除了 2 株 H 抗原歸類為 z4 complex 檢測結果為陰性外，其他所有菌株之檢測結果均為陽性。450 例豬糞便檢體中，以 PCR 檢驗有 49 例(10.89 %)為陽性。MPCR 檢驗結果與傳統培養及鑑定法結果相符。傳統培養及鑑定法共分離到 49 株沙門氏桿菌分離株，其中包括 12 種不同血清型。50 例鴨糞便檢體中，MPCR 檢驗結果均為陰性，與傳統培養及鑑定結果相符。因此本方法確能有效檢出沙門氏桿菌，檢驗所需時間最長不超過 18 小時，可應用於沙門氏桿菌的快速輔助檢驗。

關鍵詞: 沙門氏桿菌、複合聚合酶連鎖反應、診斷

緒言

沙門氏桿菌症是畜產養殖業的一大困擾，感染沙門氏桿菌所引起的主要的臨床症狀包括患畜下痢、失重、生長率下降及死亡等，經常造成畜產養殖的重大經濟損失，感染沙門氏桿菌也可能引發呼吸道疾病甚至敗血症等。沙門氏桿菌感染同時是公共衛生上一個重要的議題，病原菌常藉由食物污染而感染人[14]估計在美國一年因人沙門氏桿菌感染損失接近十億美元[3]。目前政府積極推動之「危害分析重要管制點」(HACCP)系統，強調預先防範危害的發生，以達成食品衛生安全的嚴格標準。在此衛生監督管理制度中，沙門氏桿菌的污染也是一項重點檢驗項目。因此在獸醫、醫學、公共衛生及環境保護等領域，沙門氏桿菌的污染檢測均是一項重要的工作。也因此目前市售沙門氏桿菌的鑑定套組為數眾多，例如利用生化特徵鑑定的至少有 18 種、核酸分析鑑定的至少有 4

種、血清學鑑定則至少有 25 種以上。

沙門氏桿菌屬之血清型超過 2400 種，還陸續增加中。依照國內衛生署、美國 FDA 或 OIE 公告的傳統鑑定方法包括培養、生化試驗及血清學鑑定至少需時 4-7 天。一個檢體最少需作 10 種以上的生化性狀及血清學測試，所以檢體數量太多時處理相當困難。此外檢體保存不當、雜菌太多或抗生素的使用等都會影響細菌分離率，而菌落如轉變成粗糙型則會影響血清型鑑定。因此為了縮短鑑定時間，本研究研發利用聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)來輔助沙門氏桿菌之鑑定。

材料與方法

菌株

所測試之沙門氏桿菌屬共有 263 株包括 *Sal. enteritidis* bio ser Paratyphi A(ATCC 9150、

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

CCRC12949)、*Sal. enteritidis* ser Typhimurium (ATCC 14028, CCRC 12947, 10747)、*Sal. enteritidis* ser Cholerasuis (CCRC10743)、*Sal. enteritidis* ser Typhi (CCRC12948, 14875)、*Sal. enteritidis* ser Dublin (CCRC13852)、*Sal. enteritidis* ser Breukelen (CCRC15453)、*Sal. enteritidis* ser Arizonae (CCRC10742)、*Sal. enteritidis* ser Bredeney (CCRC15452)等 12 株標準株及由豬、雞、鴨、人等動物分離之分離株 251 株(分別分讓自屏科大獸醫學系廖明輝教授、台糖公司張靖男博士及永達技術學院林德田博士及自行分離)。

沙門氏桿菌分離株之生化性狀鑑定

251 株沙門氏桿菌分離株之性狀測試及鑑定是依據衛生署公告之食品微生物之檢驗法-沙門氏桿菌之檢驗(中華民國九十一年十月十四日衛署藥檢字第○九一○○六四二四四號)所列之方法檢測。沙門氏桿菌性狀測試項目包括 Triple sugar iron agar (TSI agar)、葡萄糖發酵、離氨酸脫氨酶試驗、硫化氫、尿素酶試驗、酚紅甜醇培養液、氰化鉀培養液、丙二酸鹽培養液、indol 試驗、酚紅乳糖培養液、酚紅蔗糖培養液、歐普氏試驗、甲基紅試驗、辛蒙斯檸檬酸鹽培養基及多價本體及鞭毛試驗等。血清型鑑定分成體抗原(O 抗原)及鞭毛抗原(H 抗原)鑑定,標準抗血清使用 Bacto-Salmonella O 及 H antisera。O 抗原測定方法為平板凝集反應, H 抗原之測定則使用試管凝集試驗。

沙門氏桿菌聚合酶連鎖反應(PCR)測試

所測試之沙門桿菌屬共有 263 株,如上述。陰性對照為 *E. coli* (ATCC 35150, 43888, 43889, 43894), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bordetella bronchiseptica*, *Campylobacter jejuni* (CCRC 12876), *Shigella sonnei* (BCRC10773, BCRC10774, BCRC15966, BCRC15967), *Shigella boydii* (BCRC15960, BCRC15958, BCRC15959), *Shigella flexnerii* (BCRC10773)等。引子同時使用兩對,分別為依

據 *invA* gene 自行設計之 A 對引子及依據 IS200 序列自行設計之 B 對引子等。陽性反應之產物預期長度分別為 780 bp 及 482 bp(表 1),有任一預期長度之產物即判定為陽性。測試菌株 DNA 模版之製備是將菌液以格蘭陰性菌菌體核酸純化套組(AR-BIO™)抽取及純化 DNA。本實驗中每個標準反應體積為 10 μ L,其中包括 1 μ L reaction buffer、1 μ L dNTP's (各 2mM)、2 μ L primer's (A 對引子 2 μ M, B 對引子 0.5 μ M)、1 μ L Taq (0.4U, Promega)、1 μ L 測試樣品、4 μ L H₂O。以變性反應(denaturation) 94°C 1 秒、煉合反應 (annealing) 53°C 1 秒、合成反應 (elongation) 74°C 30 秒等三個階段重覆進行 35 個循環。分別以上述菌株 DNA 進行測試,再以電泳分析試驗結果。

糞便檢體中沙門氏桿菌之檢測

鴨糞便是採本所實驗鴨舍糞便共 50 例。豬糞便檢體由 94 年 3 月至 11 月赴北部某電動屠宰場,月採 50 例共 450 例。採樣是以無菌棉棒插入豬肛門內採糞便檢體,再將棉棒置入四硫代硫酸鹽培養液(Tetrathionate broth, TT),置於 37 °C 培養箱培養約 18 小時。培養液再分別依衛生署公告之食品微生物之檢驗法-沙門氏桿菌之檢驗方法進行培養及鑑定沙門氏桿菌。另取 1 mL 以格蘭陰性菌菌體核酸純化套組(AR-BIO™)抽取及純化細菌 DNA,再以上述 PCR 方法檢測。

結果

251 株沙門氏桿菌之性狀測試,結果其培養型態與生化特徵均很類似,主要差異在酚紅甜醇之利用,但是所有生化性狀及血清學鑑定結果均符合。所測試之沙門桿菌屬 263 株包括有 23 種以上不同血清型,其中 O 抗原有 A、B、C1、C2、D1、D2、E1 及 E2 群等。以 PCR 檢測結果為除了 2 株 H 抗原歸類為 z4 complex 檢測結果為陰性外,其他所有菌株之檢測結果均為陽性。檢測陽性之沙門氏桿菌之 PCR 反應中,產物為 482 bp (IS200)者有 34.6 % (91/263),產物為 780 bp (*invA*)者有 45.2 %

(119/263)，產物為 482 bp 及 780 bp 者有 19.4 % (51/263)。其中所有 *Sal. Cholerae* 之產物均只有 780 bp。

450 例豬糞便檢體中，沙門氏桿菌培養及傳統鑑定之結果共有 49 例陽性(10.89 %)及 401 例陰性，共分離到 49 株沙門氏桿菌分離株，其中包括 12 種不同血清型。同樣的糞便檢體，以 PCR 測試結果為豬糞便檢體陽性亦有 49 例。豬糞便檢體陽性

49 例中，產物為 482 bp (者有 0 % (0/49)，產物為 780 bp 者有 38.8 % (19/49)，產物為 482 bp 及 780 bp 者有 61.2 % (30/49)如圖 1。50 例鴨糞便之沙門氏桿菌培養及傳統鑑定結果則均為陰性，PCR 檢驗亦均為陰性。由以上豬及鴨糞便檢測結果，PCR 與傳統鑑定之結果一致，因此特異性及敏感性均為 100%，詳如表 1。

表 1. 菌株及糞便檢體之 mPCR 陽性率

	mPCR 陽性率			
	482 bp	780 bp	482 及 780 bp	合計
陽性菌株 ^{1,2}	34.6 % (91/263)	45.2 % (119/263)	19.4 % (51/263)	99.2 %
陰性菌株	0 % (0/15)	0 % (0/15)	0 % (0/15)	0 %
陽性糞便檢體 ³	0 % (0/49)	38.8 % (19/49)	61.2 % (30/49)	100 %
陰性糞便檢體	0 % (0/451)	0 % (0/451)	0 % (0/451)	0 %

1. 所有陽性、陰性菌株及檢體均經細菌培養、生化特徵及血清學鑑定。
2. 陽性菌株之整體陽性率為 99.2%，其中 2 株 H 抗原為 z4 complex 檢測結果為陰性。
3. 糞便檢體共 500 例，其中包括 50 例鴨糞便檢體。由糞便檢體計算所得之敏感性與特異性均為 100 %。

討論

沙門氏桿菌症現階段的主要診斷方法，仍然主要還是依靠病原菌之培養及傳統生化性狀及血清學鑑定。但是傳統鑑定方法卻有耗時及繁雜等缺點，目前在許多病原菌包括沙門氏桿菌不同血清型的檢驗，也常使用 PCR 來縮短檢驗時間[5, 13, 16]包括數種快速檢定糞便中的沙門氏桿菌的方法也被發展出[1,4,6,9,16]。但由於糞便中含有多種 PCR 抑制因子包括多醣類、酚類、蛋白及 Dnase 等，常會影響 PCR 反應的結果[17]。此外在某些方面如血清型鑑定及抗生素敏感試驗等，傳統培養方法仍是不可取代的。Malorny (2005)列舉了數項利用 PCR 檢測糞便檢體沙門氏桿菌的注意事項，其中包括慎選 PCR

前培養的培養基、清除檢體中 PCR 抑制因子、同一檢體需重覆檢測 2 次等[11]。

應用 PCR 檢測沙門氏桿菌，引子的設計常用的基因有 16S rDNA、invA、invE、IS200、hliA [7,12]、spvC [4]、enterotoxin gene 等。但由於沙門氏桿菌的血清型多達 2000 多種，這些基因序列常常無法函蓋全部血清型，使用不同基因會影響到檢測範圍。報告指出經比較 9 種不同常用基因後，發現只有 3 對包括 16S rDNA、stn 及 histidine transport operon 較適用沙門氏桿菌的 PCR 診斷[18]。但 stn 經本實驗室測試結果，容易與其它腸內菌科有非特異性反應。此外使用 hliA 會與 *Yersinia enterocolitica* 有交叉反應[7]。rfbJ、fliC 及 fljB 可

用以區別鑑定 *Sal. Typhimurium* 與其它血清型[8]。在歐洲一個有 15 個實驗室參與的評估計畫中，比較了 4 對引子後指出以 *invA* 最適合應用於沙門氏桿菌的 PCR 診斷，242 株沙門氏桿菌正確檢出率達 99.6%，122 株非沙門氏桿菌正確率達 100 % [10]。但也有報告指出在 *Sal. Typhimurium* 中有 98 % 菌株 *invA* 為陽性、88 % *spvC* 為陽性 [2]。Rhan 也指出 2 株血清型屬於 Litchfield 及 2 株屬於 Senftenberg 的菌株 *invA* 為陰性[13]。*invA* 在本實驗中測試菌株的陽性率只佔測試菌株的 68.4%，IS200 則佔 54.8%。以 *invE* 測試結果類似 *invA*。因此併用 *invA* 及 IS200 可擴大檢測範圍。在實驗

中除了兩株 H 抗原屬於 z4 complex 以外沒有被檢出外，其它測試菌株均可被檢出。在本實驗中豬糞便檢體之沙門氏桿菌檢出率達 10.89 % (49/450)，Tran 調查越南 2 至 4 月齡之豬糞便中沙門氏桿菌檢出率為 5.2 % (23/439) [15]。

此外本實驗中所用的菌株其血清型分布雖為常見的 A、B、C、D 及 E 群，但仍缺其它如 F、G、H……等血清群，故適用範圍仍需後續確認。不過由糞便檢體 PCR 的檢測結果與傳統鑑定法之結果一致，顯示本實驗研發之方法確能有效檢出沙門氏桿菌，因此可適用於沙門氏桿菌的快速輔助檢驗。

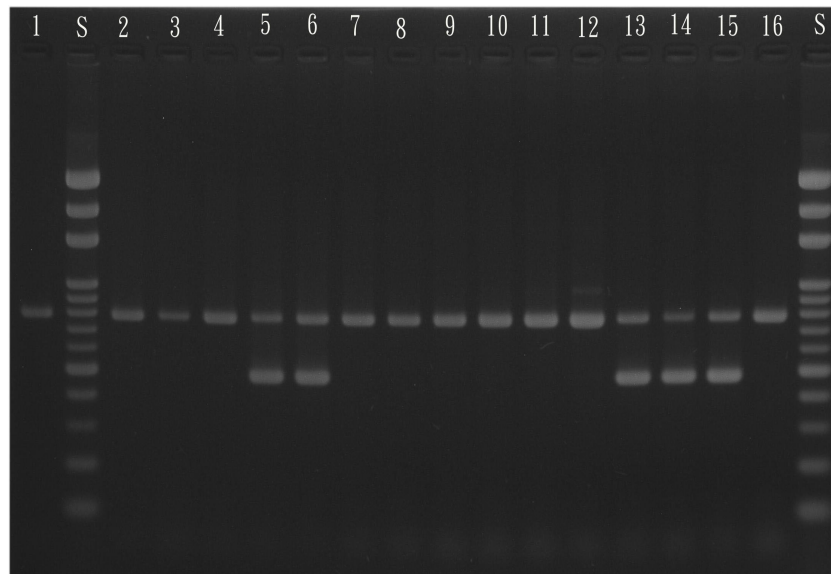


圖 1. 應用 PCR 檢測豬糞便檢體,同一反應使用 2 對引子，其預期產物長度分別為 482 bp 及 780 bp。1 至 16 為不同病材檢體,均為陽性反應。S 為 100 bp DNA ladder (Protech)。

參考文獻

1. Aabo S, Rasmussen OF, Rosen L, Sorenson PD, Olson J E. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probes 7:171-178. 1993.
2. Bolton LF, Kelley LC, Lee MD, Fedorka-Cray PJ, Maurer JJ. Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol. J Clin Microbiol. 37(5):1348-51. 1999.

3. Buzby JC, Roberts T, Lin CTJ, MacDonald JM. Bacterial foodborne disease—medical costs and productivity losses. USDA Economic Research Service, Washington, D.C. 1996.
4. Chiu CH, Ou JT. Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *J Clin Microbiol* 34, 2619–2622. 1996.
5. Cohen ND, Neibergs HL, McGruder ED, Whitford HW, Behle RW, Ray PM, Hargis BM. Genus-specific detection of salmonellae using the polymerase chain reaction (PCR). *J Vet Diagn Invest.* 5(3):368–371.1993.
6. Cohen, ND, Neibergs HL, Wallis DE, Simpson RB, McGruder ED, Hargis BM. Genus-specific detection of salmonellae in equine feces by use of the polymerase chain reaction. *Am. J. Vet. Res.* 55:1049–1054. 1994.
7. Guo X., Chen J, Beuchat LR, Brackett RE. PCR detection of *Salmonella enterica* serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from *hliA*. *Appl Environ Microbiol* 66, 5248–5252. .2000.
8. Lim YH, Hirose K, Izumiya H, Arakawa E, Takahashi H, Terajima J, Itoh K, Tamura K, Kim SI, Watanabe H. Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Jpn J Infect Dis.* 56(4):151-5. 2003 .
9. Luk JM, Kongmuang U, Tsang RSW, Lindberg AA. An enzyme-linked immunosorbent assay to detect PCR products of the *rfbS* gene from serogroup D salmonellae: a rapid screening prototype. *J. Clin. Microbiol.* 35:714–718. 1997.
10. Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, Helmuth R. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Appl Environ Microbiol.* 69(1): 290-6. 2003.
11. Malorny B, Hoorfar J. Toward standardization of diagnostic PCR testing of fecal samples: lessons from the detection of salmonellae in pigs. *J Clin Microbiol.* Jul;43(7):3033-7. 2005
12. Pathmanathan SG, Cardona-Castro N, Sa'nchez-Jime' nez MM., Correa-Ochoa MM, Puthucheary SD, Thong KL. Simple and rapid detection of *Salmonella* strains by direct PCR amplification of the *hliA* gene. *Journal of Medical Microbiology* 52, 773–776. 2003.
13. Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C, Curtiss R 3rd, Gyles CL. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol Cell Probes.* 6(4):271–279. 1992.
14. Thorns, C. J. Bacterial food-borne zoonoses. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* 19:226–239. 2000.
15. Tran TP, Ly TL, Nguyen TT, Akiba M, Ogasawara N, Shinoda D, Okatani TA, Hayashidani H. Prevalence of *Salmonella* spp. in pigs, chickens and ducks in the Mekong Delta, Vietnam. *J Vet Med Sci.* Aug;66(8):1011-4.2004.
16. Widjoatmodjo, MN, Fluit AC, Torensma R, Verdonk GP, Verhoef J. The magnetic immuno polymerase chain reaction assay for direct detection of salmonellae in fecal samples. *J. Clin. Microbiol.* 30:3195–3199. 1992.
17. Wilson, IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3741–3751. 1997.
18. Ziemer CJ Steadham SR. Evaluation of the specificity of *Salmonella* PCR primers using various intestinal bacterial species. *Lett Appl Microbiol.* 37(6):463-9. 2003

Detection of Salmonella by multiplex polymerase chain reaction

Chang WM^{*1}, Liao MH², Lin KF¹, Huang SM¹, Kuo JH¹, Shiau JR¹

¹ Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

² Department of Veterinary Medicine, National Pingtung University of Science and Technology

Abstract A multiplex polymerase chain reaction (mPCR) assay, using two sets of primers designed according to the sequences of *invA* and *IS200* genes, was developed for the identification of *Salmonella*. The mPCR assay was evaluated by using 12 seed strains and 251 isolated strains, which were attributed to more than 23 different serovars of group A, B, C1, C2, D1, D2, E1 and E2. All strain tested, except 2 possessed z4 complex (H antigen) strains, were positive in the mPCR assay. The mPCR assay was compared with the traditional culture and biological characteristics to determine the specificity and sensitivity of the test. Using a total of 450 swine fecal samples collected from slaughterhouse during 9 months, 49 samples were identified to be positive in both the mPCR assay and the traditional culture and biological characteristics. In addition, 50 duck fecal samples collected from animal house of duck were also tested, and all were found to be negative in both assays. Thus, the mPCR assay developed can be practically used as an auxiliary step for identifying *Salmonella*.

Key words: Salmonella, multiplex polymerase chain reaction, diagnosis

*Corresponding Author
Animal Health Research Institute